昆虫防御分泌物及体内体外免疫权衡

蒲宇辰，侯有明*，石章红，梁馨予

（福建农林大学闽台作物有害生物生态防控国家重点实验室/福建省昆虫生态重点实验室，福州 350002）

摘要：昆虫免疫在昆虫抵御有害外源刺激的过程中具有重要的生理调控作用，因而近年来受到了广泛关注。虽然体内免疫和体外免疫皆为昆虫免疫防御系统的组成部分，但是传统观点普遍认为，体内免疫是昆虫迅速和主要的免疫反应，而体外免疫防御仅仅被认为是一种次要的免疫响应。然而，以分泌防御物为核心的体外免疫却构成了外源异物入侵昆虫的第一道防线。因此，体外免疫和体内免疫是昆虫的两种免疫防御策略。当昆虫遭受外来生物入侵或外界不良环境因子影响时，为了抵御天敌或抵抗逆境，它们将优先选择体外免疫防御策略。但是，昆虫在整个防卫过程中，体内免疫和体外免疫却是同步进行的，这将涉及到两种免疫防御策略之间的能量分配问题。同时，当昆虫受到外源物入侵时，必然启动一系列的免疫响应来阻止潜在的威胁，这将严重影响到害虫生物控制的效果。本文以昆虫体外免疫为焦点，就昆虫防御分泌物、两种免疫防御策略及其权衡进行综述，旨在了解昆虫防御分泌物及体内体外免疫权衡的研究现状和重要作用，深入剖析昆虫和外源因子的免疫互作效应和多样化的免疫防御策略，为促进该领域的发展和开发以昆虫免疫系统为靶标的新型杀虫剂提供新的思路和方法。

关键词：防御分泌物；免疫防御策略；体外免疫；体内免疫；权衡

中图分类号：Q966　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0454-6296(2017)08-0962-13

Defensive secretions and the trade-off between internal and external immunity in insects

PU Yu-Chen, HOU You-Ming*, SHI Zhang-Hong, LIANG Xin-Yu (State Key Laboratory of Ecological Pest Control for Fujian-Taiwan Crops, Key Laboratory of Insect Ecology in Fujian, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Abstract: Insect immunity has gradually attracted broad attention in recent years because of its important physiological functions in the process of insect resistance to harmful exogenous stimuli. Although both internal and external immunity are parts of the insect immune defense system, it is generally believed that the internal immunity is an immediate and primary immune response of insects while the external immune defense is only considered as a kind of secondary immune response. Nevertheless, the external immunity using defensive secretions as the core component constitutes the first barrier to foreign substances which invade insects. Accordingly, external immunity and internal immunity are two kinds of immune defense strategies for insects. When insects suffer exotic organism infection or adverse environmental factors, the external immunity is often the priority to be employed to fight against the invasion of natural enemies or adversity. However, the internal immunity and external immunity are both synchronized in the whole process of defense, which will cause a dilemma on energy allocation between the two defense strategies. Moreover, it is essential for insects to employ a series of immune reactions to prevent potential threats, which will seriously impair the effectiveness of pest biological control. This review focuses on insect external immunity and summarizes the current understandings on defensive secretions in insects, as well

基金项目：国家自然科学基金项目(31471829)；国家重点研发计划课题(2017YFC1200605)

作者简介：蒲宇辰，男，1992 年 4 月生，福建漳州人，博士研究生，主要从事入侵昆虫病原学、毒理学及免疫学研究，E-mail：fafupuyuchen@163.com

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail：ymhou@fafu.edu.cn

收稿日期 Received：2017-02-27；接受日期 Accepted：2017-06-14

as the two immune defense strategies and their trade-offs, aiming to provide a synthesis of important updates, potential applications, and novel ideas and technologies for further research in this area. Also, the related research will not only contribute to further analysis about the immune interaction and diversified immunization strategies between insects and exogenous factors to improve the control effect in the field, but also pave the way for the development of novel insecticides targeting the insect immune system.

Key words: Defensive secretion; immune defense strategy; external immunity; internal immunity; trade-off

昆虫是生物界种类最多、分布最广、数量最大的一类节肢动物(许再福, 2009)。然而在自然界中，各种昆虫不可避免地遭受到捕食者和寄生者(寄生蜂、寄生蝇、寄生线虫、病原微生物等)天敌的入侵或其他外界不良环境因子(温度、湿度、酸碱性、种群密度等)的影响(崔旭红等, 2007; 徐利等, 2011; 华瑞香等, 2014; Tang *et al*., 2014; Pu and Hou, 2016; Pu *et al*., 2017)。为了个体生存和种群繁衍，它们进化出了以免疫系统为核心的多种防御策略，以抵御各种外来异物和克服逆境(Shi *et al*., 2014, 2016; 冯珊珊和侯有明, 2015)。目前，大多研究认为昆虫免疫防御系统是在生物体内发挥作用，它具有感知和响应能够威胁寄主生物完整性和平衡性的多种病原体的能力(Theopold *et al*., 2004; Lazzaro and Rolff, 2011)，如通过体液免疫或细胞免疫等体内免疫途径，对细菌、真菌、病毒或大型寄生物等多种大量入侵至体内的有害生物做出响应(Hoffmann *et al*., 1996; 吕鸿声, 2008; Shi *et al*., 2015; Meng *et al*., 2016)；同时这也是适应外界不良环境条件的途径(Mikkola and Rantala, 2010)。但是，昆虫一旦遭到外源物入侵胁迫时，并非立即启动体内免疫防御系统，而是发挥第一道防线的“体外免疫”防御策略，尽可能将大部分外源物阻挡在昆虫体外(Otti *et al*., 2014; Silva *et al*., 2016)。传统观点认为，体内免疫是昆虫迅速和主要的免疫反应，而包括表皮和外部分泌物在内的外部免疫防御系统的功能不受到重视，因而目前国内外针对昆虫体外免疫的研究仍然屈指可数，内部免疫和外部免疫之间的权衡关系也未能完全诠释。然而外部免疫却构成昆虫对病原菌的第一道屏障，操控着微生物环境，同时能够有效逃避天敌的捕食、寄生和躲避逆境等(Otti *et al*., 2014; Zhou *et al*., 2016)。因此，体外免疫和体内免疫是同时存在的，且体外免疫启动和发生的时间稍早于体内免疫。

近年来，越来越多的研究已经表明，抗菌物不仅仅在昆虫体内发挥作用，也能通过昆虫的分泌腺体分泌到体外，起到抗菌作用(Graystock and Hughes, 2011; Li *et al*., 2013)。由于这些分泌至体外的抗菌物形成了对微生物的一种防御功能，因而应将这些体外分泌抵御物作为免疫系统和外部免疫防御的重要组成部分(Otti *et al*., 2014)。而且通过外部免疫系统，昆虫能够在早期阻止潜在的威胁，降低病原菌的寄生压力等(Hamilton *et al*., 2011a; Bulmer *et al*., 2012)。事实上，外部防御化合物的相关文献已经揭示了不同动物类群中抗菌分泌物无处不在。据报道，蛛形纲和两栖动物的表皮能够分泌抗菌物(Kuhn-Nentwig, 2003; Rollins-Smith *et al*., 2005)，同时人的皮肤也存在抗菌物以保护人免受病菌的感染(Gallo and Hooper, 2012)。虽然已有昆虫体外分泌物的零星报道，同时有研究证据表明这些分泌物存在抗菌活性，但是在免疫防御，尤其是体外免疫中，它们的角色和重要性还不能很好地被理解。本文以昆虫的体外免疫为焦点，重点阐述了昆虫外部防御分泌物及体内体外免疫权衡的研究进展，同时以此为立足点，展望昆虫体外免疫的研究前景。

1　昆虫的两种免疫防御策略

1.1　内部免疫防御

昆虫内部免疫防御主要依靠增加血细胞的吞噬、成瘤、包囊和凝集等作用，或者提高血浆中某些物质的浓度来发挥免疫能力，前者属于细胞免疫，后者属于体液免疫(王荫长, 2004)。其中，体液免疫依赖于血淋巴中的先天性免疫和后天性免疫两种因子，具体而言，该免疫类型又可分为凝结作用、黑化反应和抗菌肽(antimicribial peptides, AMPs)的产生等过程(吕鸿声, 2008)。

酚氧化酶(phenoloxidase, PO)是昆虫免疫系统的重要组成成分，是昆虫体内一种先天性免疫因子，发挥着重要的作用，它既参与昆虫的细胞免疫，同时

又和体液免疫息息相关(徐亚玲和李文楚, 2010)。PO通常以酚氧化酶酶原(prophenoloxidase, proPO)的形式存在于昆虫的血淋巴、血细胞、表皮及中肠等组织中(王荫长, 2004; 吕鸿声, 2008)。对家蚕*Bombyx mori*和折翅蠊*Blaberus craniifer*等的研究表明,在病原菌侵染寄主的过程中,当病原物的表面被识别后,引发一系列丝氨酸蛋白酶的级联反应,最终凝血酶原被激活,导致血淋巴的凝结,进而激活proPO级联反应。同时,proPO级联被细菌细胞膜中的脂多糖和肽聚糖或真菌细胞壁中的β-1,3-葡聚糖所激活后,释放出PO。在分子氧存在的情况下,PO能把单酚物质氧化成邻苯二酚,进而再氧化成醌,最终聚合成黑色素,这就是"黑化反应"。同时,proPO级联的激活又可刺激血细胞附着、延展和去颗粒化,进而发生细胞免疫(Ashida and Yamazaki, 1990; 王荫长, 2004; 徐亚玲和李文楚, 2010; Tang *et al*., 2014; Meng *et al*., 2016)。

目前,大量研究表明,昆虫体内免疫系统中主要存在着3种信号转导通路,其中两种通路是通过模式识别受体(pattern recognition receptor, PRR)(Toll和Imd)调节,而第3种通路是通过来自组织的压力信号[酪氨酸激酶(janus kinase, JAK)/信号转导与转录激活因子(signal transduction and activators of transcription, STAT)]调节(Ratzka *et al*., 2011; Schmid-Hempel, 2011)。这些通路有大量的免疫效应因子,包括AMPs、活性氧和外源凝集素(Schmid-Hempel, 2011)。因此,这些通路与免疫细胞和效应器一起形成了内部免疫系统的基础。对于体内免疫系统而言,AMPs可能是一种最佳的免疫效应分子。目前在昆虫中已经鉴定出了几百个不同的AMPs(Schmid-Hempel, 2011),它们具有种间多样性的特征(Waterhouse *et al*., 2007)。在一定程度上,当昆虫受到病原物或寄生物等侵染时,必然能够诱导虫体内部产生免疫反应(Schmid-Hempel, 2011)。

从进化角度而言,体内免疫是一种多特征防御系统的结果(Sadd and Schmid-Hempel, 2009)。这种多特征系统不仅仅是由寄主和寄生物的共同进化而形成的(Schmid-Hempel, 2011),而且也会受外界多种生态因子的影响,例如温度(Fellowes *et al*., 1999)、食物(Brunner *et al*., 2014)和栖息地(Corby-Harris and Promislow, 2008)等。环境、社会组织水平、寄主种群密度和病原压力等方面的改变,会影响到昆虫在体内免疫上的投资程度(Rolff and Siva-Jothy, 2003)。因此,昆虫个体在对免疫系统的要求方面是有差异的。昆虫个体对环境中病原体抗性的变化可以形成机体的免疫功能,同时可能影响到免疫性状的进化。目前,关于体内免疫的机理研究虽然主要集中于与防御反应相关的基因,但是也可能会涉及到宿主生理学这种较广的层面(Lazzaro and Little, 2009),例如欧洲熊蜂*Bombus terrestris*的营养状态可能会影响到免疫基因的表达(Brunner *et al*., 2014),黑腹果蝇*Drosophila melanogaster*受到病原菌感染之后会引起厌食等(Ayres and Schneider, 2009)。

1.2 外部免疫防御

昆虫免疫性状的选择是受寄主环境改变而驱使的,这可能是基于生物和非生物因子。这种变化的一个重要来源是生物周围的微生物群落。但是,这些微生物对昆虫造成的胁迫并不一定通过内部免疫防御来缓解,以分泌体外抗菌物为核心的外部免疫防御也可以减轻微生物侵染的压力,然而昆虫个体使用外部免疫防御策略的能力是有所不同的。

纵观近年来的研究,昆虫外部免疫防御主要有两种类型,一种是表皮免疫(Souza *et al*., 2013; Silva *et al*., 2016; Vannini and Willis, 2016; Zhou *et al*., 2016),另一种是化学防御(Gross *et al*., 2008; Hamilton *et al*., 2011a; Li *et al*., 2013; Joop *et al*., 2014; Betz *et al*., 2016; Ulrich *et al*., 2016)。表皮是昆虫的第一道物理防线,当外来物侵染昆虫时,必须首先突破这道防线后,才能激活体内产生一系列的免疫应答(吕鸿声, 2008)。表皮上分布有大量的蛋白,这些蛋白在表皮防御中发挥着重要的作用(Silva *et al*., 2016; Vannini and Willis, 2016; Zhou *et al*., 2016)。其中黑色素大量存在于外表皮的鞣化蛋白中,它的形成往往与表皮的黑化与硬化同时发生(王荫长, 2004)。Mikkola和Rantala(2010)研究发现,在许多工业污染严重的地区,鳞翅目昆虫,如松针毒蛾*Lymantria monacha*,会出现工业黑化现象,这就是表皮黑色素大量积累的缘故。昆虫通过启动这种表皮黑化的体外免疫方式来适应逆境。Silva等(2016)证实了黄粉虫*Tenebrio molitor*体色具有棕色和黑色两种表型的原因。当病原物侵染黄粉虫*T. molitor*时,表皮会立即发生黑化与硬化,从而在体外的层面上抵御病原物的胁迫。同时,黑色素沉积于微生物或寄生物周围,与结节一起形成机械屏障,也可能对入侵的病原物表现毒性作用(王荫长, 2004)。化学防御是一种重要的体外免疫防御,除了分泌腺体合成并分泌至体外的化学防御物

质以外，表皮也能产生一些化学分泌物，起到防御功能（Souza *et al.*, 2013）。这就说明了，这两种不同类型的体外免疫防御方式并不是孤立存在的，它们之间具有交叉重叠的部分。此外，外部免疫防御策略除了表皮防御和化学防御以外，还包括个体对环境中微生物的分布有影响的其他行为（Otti *et al.*, 2014）。

昆虫和其他节肢动物普遍存在体外抗菌分泌物，这些分泌物可能是由个体自身产生的（Joop *et al.*, 2014），也可能是来自于生物或非生物环境因素（Christe *et al.*, 2003；Chapuisat *et al.*, 2007；Simone *et al.*, 2009），或者是源于生物之间的共生关系（Vásquez *et al.*, 2012；Kaltenpoth and Engl, 2014）。虽然我们也可以把肠道当作是一种外部的环境，但是肠道免疫以及体内免疫系统和肠道微生物之间的特殊关系已经作为一个单独的领域被研究（Engel and Moran, 2013）。因此，体外免疫防御中化学防御的研究重点主要集中于个体自身所产生的体外防御分泌物质，而不明确探索肠道中的抗菌物。

昆虫个体自身产生的体外抗菌防御物质主要由外分泌腺体释放到外界环境中发挥作用（Kuhn-Nentwig, 2003；Moreau, 2013）。外分泌腺体分泌物的抗菌活性对于自身或巢穴的卫生清洁，以及在猎物或食物的保存中具有突出的作用（Kuhn-Nentwig, 2003）。一般而言，外分泌腺的分泌物可能是毒素、酸或酶等防御复合物（Blum, 1981；Roth and Eisner, 2003），也可能是体内免疫系统的组分，例如 AMPs 和结合病原相关分子模式（pathogen-associated molecular patterns, PAMPs）的模式识别受体（Hamilton *et al.*, 2011a）。因此，认识体外防御分泌物的起源或前体对于体外免疫的研究是至关重要的。Zhu 等（2014）通过实验将防御素转化为毒素，证实了 AMPs 和神经毒素之间的一种进化关系。

与体内免疫系统相似，科学家在昆虫的外分泌腺体中也分离到了少量的 AMPs，例如中华蜜蜂 *Apis cerana cerana* 的蜂毒肽和丝光绿蝇 *Lucilia sericata* 的荧光素（Bulet *et al.*, 2004；Thompson *et al.*, 2013）。AMPs 基因的迅速分化和高特异性是体外免疫防御进化和维持的先决条件。在白蚁中，AMPs *termicin* 基因、模式识别蛋白（pattern recognition protein, PRP）和革兰氏阴性结合蛋白（gram-negative binding protein, GNBP）等外源成分已经经历了基因复制，而且我们认为这是一种正选择（Bulmer and Crozier, 2004, 2006；Bulmer *et al.*, 2009, 2012）。白蚁种间 *termicin* 基因数量的变化在一定程度上很可能是病原菌压力和栖境改变而造成的（Bulmer and Crozier, 2004）。此外，白蚁种间 GNBP 基因的研究表明，有着相似微生物压力的栖境导致了 GNBP 基因的趋同进化（Bulmer and Crozier, 2006）。

2 昆虫体外防御分泌物

2.1 体外防御分泌物的产生

昆虫外部免疫主要通过昆虫特殊的外分泌腺体合成并分泌化学防御物质，释放至体外发挥其免疫功能（王香萍等, 2001）。然而这些外分泌腺体在不同昆虫类群中的分布具有很大差异，主要包括头腺（Rosengaus *et al.*, 2011）、胸腺（Prendeville and Stevens, 2002；Yezerski *et al.*, 2007）、腹腺（Rosengaus *et al.*, 2004；Lusebrink *et al.*, 2008；Gasch *et al.*, 2013；Tragust *et al.*, 2013）和体壁腺（王香萍等, 2001），尤以腹腺（毒腺、杜氏腺、臀腺、肠腺等）分泌居多。此外，翅基、跗足和腹管等部位也能产生防御分泌物（Goff and Nault, 1974；Rowell-Rahier and Pasteels, 1994）。

对于一种昆虫而言，体外防御分泌物的产生部位或许不只一处。Li 等（2013）在研究模式昆虫赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* 与防御物质醌类化合物合成有关基因的过程中发现，腹腺和前胸腺均是醌产生和分泌的部位。Thompson 等（2013）研究表明，双翅目绿蝇属 *Lucilia* 的唾腺和肠道腺皆能产生防御分泌物。

2.2 体外防御分泌物的化学成分

气相色谱-质谱联用（gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS）技术综合了色谱法的高分离效率和质谱法的定性长处，可在较短时间内对多组分混合物进行分析，因此该法逐渐成为定性定量分析复杂混合物最为有效的手段之一（郭明等, 2013）。昆虫的这些防御分泌物质往往不是单一的组分，而是由复杂的化学混合物组成，甚至很大一部分是挥发性的微量有机物，因此随着 GC-MS 技术的不断完善和发展，该方法在定性和定量分析昆虫外部防御分泌物化学组成上显得格外重要（关万鹏, 1987）。

目前国内外关于昆虫体外免疫防御分泌物化学组成成分的鉴定和研究主要集中于鞘翅目、膜翅目和半翅目等几个为数不多的与农林业生产关系较为密切的昆虫目中（表1），同时研究昆虫体外免疫及

表 1 部分昆虫体外免疫防御分泌物的主要化学成分

Table 1 The main chemical constituents of the external immune defensive secretions in some insects

目 Order	科 Family	属/种 Genus/Species	防御分泌物或其主要成分 Defense secretions or their main components
鞘翅目 Coleoptera	拟步甲科 Tenebrionidae	赤拟谷盗 *Tribolium castaneum*	醌类物质 Quinones
		杂拟谷盗 *Tribolium confusum*	醌类物质 Quinones
		琵琶甲 *Blaps* spp.	1-十三烯 1-Tridecylene, 苯醌 Benzoquinone
		黄粉虫 *Tenebrio molitor*	2-甲基对苯醌 2- Methyl-*p*-Benzoquinone, 对甲酚 *p*-Cresol
	埋葬甲科 Silphidae	埋葬虫 *Nicrophorus americanus*	溶菌酶 Lysozyme
	叶甲科 Chrysomelidae	柳叶甲 *Phratora vitellinae*	水杨醛 Salicylaldehyde
半翅目 Hemiptera	臭虫科 Cimicidae	温带臭虫 *Cimex lectularius*	(*E*)-2-己烯醛(*E*)-2-Hexenal, (*E*)-2-辛烯醛(*E*)-2-Octenal
膜翅目 Hymenoptera	蚁科 Formicidae	蚂蚁 Ants	蚁酸 Formic acid
	蜜蜂科 Apidae	蜜蜂 Honey bees	毒液 Venom

其与体内免疫之间的权衡关系,也几乎是以这些已鉴定出主要防御物质种类的昆虫物种作为研究对象,这为进一步提高这些害虫的生物防控效果提供了参考依据。

作为体外防御分泌物成分之一的醌类物质,主要存在于鞘翅目拟步甲科的昆虫中。研究表明,甲醌、乙醌、苯醌等醌类物质是赤拟谷盗 *T. castaneum* 防御分泌物的主要成分(梁永生, 1995; Li *et al*., 2013; Joop *et al*., 2014; Khan *et al*., 2016);从琵琶甲 *Blaps* spp. 鉴定出了多种体表防御分泌化合物,其中苯醌是一种主要物质(郭志峰等, 2000; 刘勇等, 2000; 李伟等, 2009)。同时在黄粉虫 *T. molitor* 成虫腹部产生的防御分泌物中检测出了2-甲基对苯醌等(强承魁等, 2006a, 2006b)。

烷烃和烯烃等烃类物质是昆虫防御分泌物另一类主要的化学成分。除醌类外,1-十五碳烯和1,6-十七碳二烯也在赤拟谷盗 *T. castaneum* 分泌物中占了较大的比重,发挥了一定的防御作用(梁永生, 1995)。同时,1-十三碳烯属于琵琶甲 *B.* spp. 的一种防御化合物(李伟等, 2009)。此外,在黄粉虫 *T. molitor* 成虫腹部产生的防御分泌物中检测出了 4 种长链烷烃和 1 种长链烯烃等(强承魁等, 2006b)。

醇、酮、酸、酚等化合物也是昆虫防御分泌物的成分。梁永生(1995)在赤拟谷盗 *T. castaneum* 中鉴定出了芍药醇,该物质在其分泌物中也占一定的比例。随后,郭志峰等(2000)在齿琶甲 *Blaps femoralis* 的防御腺分泌物中鉴定出了 4 种醇、2 种酮和 3 种酸。此外,黄粉虫 *T. molitor* 成虫腹部产生的防御分泌物的化学成分包含了对甲酚,然而幼虫腹部末端和蛹腹部末端体液提取物还含有 3 种有机酸,但不含毒性较强的2-甲基对苯醌和对甲酚,以及长链烯烃等(强承魁等, 2006b)。

当柳叶甲 *Phratora vitellinae* 受到外来病原物的侵染时,它会持续释放出挥发性腺体分泌物,以此对外来物起到防御和抵抗作用,而水杨醛正是这种分泌物的主要成分(Gross *et al*., 2008)。同样,醛类物质也是臭虫防御性分泌物的主要成分,温带臭虫 *Cimex lectularius* 释放出的防御分泌物含有两种主要的醛类物质,即(*E*)-2-己烯醛和(*E*)-2-辛烯醛,这两种物质具有抗真菌的活性,能显著抑制金龟子绿僵菌 *Metarhizium anisopliae* 的生长(Ulrich *et al*., 2015, 2016)。

埋葬甲 *Nicrophorus americanus* 的肛门分泌物含有溶菌酶的成分,用于保存食物,即保护尸体免受微生物的感染。因此,溶菌酶被认为是该虫的主要防御分泌物(Cotter *et al*., 2013)。

膜翅目昆虫作为社会性昆虫的典型代表,在营社会性生活的过程中不仅进化形成特有的社会免疫能力(Souza *et al*., 2013),所产生的分泌物也与其他种类的昆虫具有本质上的差异。例如蚂蚁分泌的蚁酸(Gupta *et al*., 2015)和蜜蜂分泌的毒液(Otti *et al*., 2014),除了在特殊情况下具有攻击对手的作用外,还发挥着防御的功能,因此我们认为这两类物质是该类昆虫的防御物质。

此外,对于直翅目蝗虫(Betz *et al*., 2016)、蜚蠊目蜚蠊(Bulmer *et al*., 2012; Betz *et al*., 2016)和等

翅目白蚁(Hamilton *et al.*, 2011a; Bulmer *et al.*, 2012)等昆虫的体外分泌物也有少量的研究,虽然科学家们尚未完全鉴定出这些分泌物的化学组成成分,但是研究表明,这些分泌物同样具有体外抑菌的活性。

2.3　体外防御分泌物的特殊功能及昆虫的行为反应

2.3.1　清洁与保护:由于昆虫合成和分泌的体外防御物质具有较强的抑菌效果,因此这些分泌物除了具有逃避捕食者捕食和抵抗寄生物寄生的作用外,在昆虫物种进化过程中,不断形成了有意义的"清洁与保护"功能,包括食物保存(Rose and Briggs, 1969; Prendeville and Stevens, 2002; Herzner *et al.*, 2013)、巢穴清洁(Christe *et al.*, 2003; Le Conte *et al.*, 2011; Tranter *et al.*, 2014)、保护后代(Arce *et al.*, 2012; Cotter *et al.*, 2013; Joop *et al.*, 2014)、负责个体和群体卫生(Schumacher *et al.*, 1992; Baracchi *et al.*, 2012)以及其他功能(Blum *et al.*, 1958; Gasch *et al.*, 2013)。

蚂蚁、蜜蜂等社会性昆虫是自然界一类特殊的类群。一方面,因为群体成员之间的密切联系能够促进病原体在群体内部个体之间的转移,所以巢穴内较高的种群密度可能造成一定的卫生问题;另一方面,社会性群居昆虫在群体水平上已经演变出了许多相应的卫生措施,例如清洁行为或利用抗菌分泌物等其他体外免疫防御物质,有利改善个体的健康,这被称为一种"社会免疫"现象(Cremer *et al.*, 2007; Vilcinskas, 2013; Otti *et al.*, 2014)。

2.3.2　阻碍发育:由于体外防御性分泌物在昆虫系统发生学研究和化学生态学研究等方面具有特殊的意义,因此近些年来对它的研究开始受到重视,尤其是化学成分的鉴定。然而以往对这些分泌物成分的研究多是从系统发生学及分类学方面进行的,很少涉及生理功能。但早在 20 世纪初,一些研究中便观察到杂拟谷盗 *T. confusum* 能分泌一种刺鼻液体,其挥发性气体能使面粉变成粉红色,这种粉红色的面粉味道难闻,同时这种分泌物的挥发气体能显著影响昆虫的生理,使杂拟谷盗 *T. confusum* 幼虫及蛹变形,发育成畸形的成虫(Chapman, 1926)。随后 Alexander 和 Barton(1943)才证明这种挥发性气体的主要成分就是甲醌和乙醌等醌类混合物(表 1)。

2.3.3　引诱作用:随着行为学研究技术的不断发展和完善,昆虫对这些防御物质的行为反应也逐渐成为研究的一个热点。研究表明,昆虫体外防御分泌物能引起昆虫特定的行为反应,对昆虫具有引诱(吸引)或驱避(排斥)作用。梁永生(1995)采用滤纸片法和滤纸条陷阱法测定了赤拟谷盗 *T. castaneum* 成虫防御性分泌物的主要成分、混合物和分泌腺提取液对赤拟谷盗 *T. castaneum* 老熟幼虫引起的行为响应,结果发现它们对幼虫具有引诱效果。Ulrich 等(2016)通过视频跟踪技术,观察并记录了臭虫的防御分泌物对温带臭虫 *Cimex lectularius* 的行为反应,试虫运动轨迹的分析证实了(*E*)-2-己烯醛和(*E*)-2-辛烯醛对温带臭虫 *C. lectularius* 具有引诱能力,而(*E*)-2-己烯醛和(*E*)-2-辛烯醛正是温带臭虫 *C. lectularius* 的防御分泌物(Ulrich *et al.*, 2015)。昆虫防御分泌物的引诱效果有望使其发展成为一种新型的害虫监测的手段,同时结合生理功能,也可将其用于害虫防治实践。

2.3.4　驱避作用:梁永生(1995)采用滤纸条陷阱法和面粉法测定了赤拟谷盗 *T. castaneum* 成虫防御性分泌物的主要成分、混合物和分泌腺提取液对不同性别和不同日龄的赤拟谷盗 *T. castaneum* 引起的行为响应,出乎意料的是,不同于幼虫的行为响应,它们对成虫却具有驱避作用。然而,这些分泌物对雌虫和雄虫的驱避效果并没有显著的差异,只不过与低龄成虫相比,高龄成虫对这些化合物更加敏感。利用昆虫防御分泌物的驱避作用可避免害虫的为害,实现保护植物的目标。

2.4　体外分泌物的合成通路及其调控机理

昆虫不同的防御性分泌物的合成途径差异较大。近年来,基于系统 RNA 干扰的反向遗传学(Bucher *et al.*, 2002; Tomoyasu *et al.*, 2008)、基于插入突变的正向遗传学(Lorenzen *et al.*, 2005; Trauner *et al.*, 2009)以及全注释的基因组序列(Tribolium Genome Sequencing Consortium, 2008)等遗传和基因组学工具的发展,为体外分泌物的合成通路及其调控机理的研究奠定了重要基础。由于赤拟谷盗 *T. castaneum* 拥有这些工具,因此该物种作为一种模式生物已被广泛应用于遗传学的研究中(Wang *et al.*, 2007)。在赤拟谷盗 *T. castaneum* 中,已经发现了分泌体外防御物质腺体的表型具有 *msg*, *tar* 和 *box* 等几种突变体(Engelhardt *et al.*, 1965; Beeman *et al.*, 1996)。醌作为一类主要的体外防御分泌物,已初步明确其生物合成的途径,烷基化的苯醌是由酯缩合形成的,而对苯醌产生于氨基酸(酪氨酸和苯丙氨酸)的芳香环(Blum, 1981; Meinwald *et al.*, 1966)。在腺体分泌细胞中,对苯醌

是以酚的 β-糖苷形式存在，然后被转移到腺体的内部，通过一系列的酶促反应形成具有活性的醌（Happ, 1968）。烯烃作为另一类体外防御分泌物，它通过氧化脱羧反应由脂肪酸合成（Görgen *et al.*, 1990）。然而，控制这些防御物合成和分泌的分子基础仍有待进一步确定，与这些过程相关基因的研究还较少。为了获得对防御分泌物遗传和分子基础更深层次的认识，Li 等（2013）以赤拟谷盗 *T. castaneum* 为研究对象，通过对不同分泌腺体组织的 RNA 测序和转录组测序，检测出了 511 个专一性和表达量高的腺体基因，然后借助 RNA 干扰的手段进行基因功能验证后发现，其中有 77 个基因与防御物合成和分泌有关，能够改变腺体形态和挥发性成分，同时还鉴定出了 3 个在醌的生物合成中必要的新基因，即 *Tcas-ql VTGl*, *Tcas-ql ARSB* 和 *Tcas-ql MRP*。

防御分泌物对分泌者本身也是具有一定毒性的，然而节肢动物能够采用一系列的机制来减少或避免体外分泌物对自身的毒害（Blum, 1981）。例如，马陆 *Oxidus gracilis* 自身通过酪氨酸酚裂解酶将外源分泌的有毒酚快速降解为酪氨酸（Duffey and Blum, 1977）。苯醌具有高活性、不稳定性和有毒的特性，这类物质除了被用于化学防御之外，拟谷盗属甲虫和其他昆虫利用它们作为鞣化剂来硬化角质层（Pryor, 1940; Kramer *et al.*, 2001; Suderman *et al.*, 2006），这就要求昆虫拥有一套完整的解毒系统。因此，昆虫对防御化合物自动解毒机制的认识能够提供新的害虫控制的思路。拟步甲科昆虫通过内部和外部的表皮组织避免自身受毒素分泌物的危害（Blum, 1981）。拟谷盗属甲虫是通过表皮内部的细胞器产生分泌物（Happ, 1968），并保存在由表皮内陷的储存囊中（Roth, 1943），新羽化的成虫缺少这种防御分泌物，这意味着需要建立一个自我保护屏障（Unruh *et al.*, 1998），如果能够破坏这种自我保护系统，害虫将会受到自身的伤害。

不仅仅编码 AMPs 或参与免疫信号通路因子的典型基因，而且编码与体外或社会免疫防御相关性状的基因，都应该属于社会昆虫免疫系统的一部分（Otti *et al.*, 2014）。Le Conte 等（2011）发现了几个可能与蜜蜂社会免疫相关的基因。最近在与蚂蚁近缘的一种木蚁 *Camponotus pennsylvanicus* 的研究中表明，类似蛋白酶的一种组织蛋白酶 D 是通过交哺而传递给群体中其他蚂蚁的，这导致了接受者提高了抵抗病原体感染的能力（Hamilton *et al.*, 2011b）。蜜蜂的首个基因组序列揭示了社会性昆虫与非社会性昆虫相比，其免疫相关功能基因的数量明显较少（Evans *et al.*, 2006），这表明正因为外部和内部免疫防御可能互相抵消，所以体外免疫防御或社会免疫可能能够缓解来自先天免疫因子的选择压力。然而，最近蜜蜂基因组的完善鉴定出了比之前的报道多大约 5 000 个编码基因的蛋白，这在未来的研究中需要仔细地对这些蛋白进行分析（Elsik *et al.*, 2014）。另外，其他几个膜翅目和双翅目物种的基因组序列揭示了双翅目昆虫似乎拥有异常高的免疫基因的数量，并且社会生活方式可能并非和这个数量直接相关（Fischman *et al.*, 2011）。

3 昆虫两种免疫防御策略的权衡

白蚁等社会性昆虫体外免疫的研究揭示了体内免疫防御和体外免疫防御之间存在着一种联系。与内部免疫防御相比，昆虫在外部免疫防御的投资中明显突出了环境作为选择压力的重要性。然而，环境中的哪些因子可能促使昆虫选择体外免疫防御策略？一系列的研究证实，昆虫的微环境、营养生态位和生活史等生态方面的因素在昆虫选择体外免疫防御的过程中扮演了重要的角色（Otti *et al.*, 2014）。

当遭受外来生物侵袭或外界不良环境因子时，昆虫为了抵御天敌的入侵或抵抗逆境，将立即采取两种免疫防御策略——体外免疫和体内免疫（吕鸿声, 2008; Otti *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2016）。虽然昆虫将优先选择体外免疫防御，然而在整个防御过程中，体内免疫和体外免疫却是同步进行的，它们的区别在于免疫启动时间和免疫能力强度的差异，而且这种免疫能力是随时在发生变化的（Cotter *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2013; Joop *et al.*, 2014; Khan *et al.*, 2016）。因此昆虫是如何权衡这两种免疫防御的能量分配的呢？衡量体内免疫强弱的指标包括 PO 活性、血淋巴抑菌（antimicrobial, AM）活性、血细胞数目和包囊率等（Mikkola and Rantala, 2010; Shi *et al.*, 2014; 冯珊珊和侯有明, 2015; Meng *et al.*, 2016）。衡量体外免疫功能的指标主要涉及体外分泌物的抗菌活性和表皮黑化程度等（Barnes and Siva-Jothy, 2000; Ulrich *et al.*, 2015）。不论是体内免疫还是体外免疫，昆虫均要付出很大的代价的。然而由于昆虫需要将部分能量用于除防御以外的交配繁殖（Hou and Weng, 2010; Li *et al.*, 2014; 蒲宇辰等, 2015）等其他生理行为活动，因此体外免疫和体内免疫能力的强弱有可能一种增强另一种减弱，

也有可能同时增强，甚至存在同时减弱的情况。研究表明，交配繁殖（Cotter *et al*., 2013；Joop *et al*., 2014；Khan *et al*., 2016）、伤口修复（Cotter *et al*., 2013）、种群密度（Barnes and Siva-Jothy, 2000）、寄主生理（Otti *et al*., 2014）、寄主状态（Otti *et al*., 2014；Khan *et al*., 2016）等单独因素或其综合因子，均影响和调控着昆虫两种免疫防御策略之间的权衡关系。

免疫和其他生理过程之间的联系表明，如果没有对遗传或生理相关的生活史对策施加间接压力，那么自然选择或许不能直接在免疫功能上产生作用（Zera and Harshman, 2001；Lazzaro and Little, 2009）。多种拟谷盗属的昆虫能够产生来自氨基酸的醌衍生物，例如臭腺分泌的 1,4-苯醌（Blum, 1981），这些分泌物除了对捕食者具有抵御作用外，它们对病原微生物也可以发挥抗菌活性（梁永生, 1995；Prendeville and Stevens, 2002；Yezerski *et al*., 2007；Joop *et al*., 2014）。苯醌分泌量在个体和种间是变化的，而且是可以遗传的（Yezerski *et al*., 2005）。甲虫能够根据寄生物的流行等环境因子来调节苯醌的分泌量（Yezerski *et al*., 2004），同时分泌量也会在分泌物抵抗不同微生物类群的效果上发生变化（Yezerski *et al*., 2007）。此外，甲虫也喜欢生长在酵母中，并把它当作食物来源，进而通过虫体分泌防御物而抑制其他微生物的生存（Yezerski *et al*., 2005）。这表明拟步甲科昆虫能够通过腺体分泌醌类物质作为外部免疫因子来减少或操控环境中的微生物群落，从而避免它们的食源受到污染。

通过将防御腺体中与醌的生物合成相关的基因进行沉默，证明了醌的前体物质能在分泌物不同合成与调控通路之间相互影响，同时这种基因沉默降低了分泌物的抑菌能力和体内免疫防御 PO 级联的活性（Li *et al*., 2013）。在黄粉虫 *T. molitor* 中，PO 酶活性、表皮颜色和血细胞之间负遗传相关揭示了代谢通路之间的权衡（Rolff *et al*., 2005）。假如将腺体化学防御和黑化包囊反应联系在一起，那么外部免疫防御和体内免疫性状或其他生活史对策之间存在着资源分配上的权衡（Armitage and Siva-Jothy, 2005；Li *et al*., 2013；Joop *et al*., 2014）。

黄粉虫 *T. molitor* 在高饲养密度条件下，即种群密度较高时，表皮黑化程度显著上调，这意味着虫体对病原菌具有较高的抗性（Barnes and Siva-Jothy, 2000）。然而，虽然包囊反应能力的上升是以寿命的减少作为代价，但是拟步甲科的昆虫在免疫方面的投资并不会减少寿命及其繁殖力（Armitage *et al*., 2003）。相比之下，用加热杀死的大肠杆菌 *Escherichia coli* 对赤拟谷盗 *T. castaneum* 幼虫进行免疫感染后，虫体更快的生长发育引起了成虫繁殖力的下降，但是昆虫个体的大小和寿命不受影响（Roth and Kurtz, 2008）。这些研究结果表明，昆虫在体内免疫防御和体外免疫防御上的最优投资，促使了其权衡种群密度、生长发育、寿命和繁殖力等其他生活史组分。

目前，科学家在昆虫产生抗菌防御分泌物的过程中，已经针对表皮的形成、免疫功能和生活史之间的权衡开展独立的研究。将外部免疫防御融入到生活史研究中去，这将以一种更加简洁的方式来阐明两种免疫防御策略之间的权衡关系，通过控制环境变化或研究体内体外免疫防御性状，将能够揭示体内体外免疫的最佳投资权衡。

4 小结与展望

害虫的生物防治，由于具有毒性低、对靶标的特异性和环境友好等优势（Marrone and Maclnyosh, 1993；Roh *et al*., 2007），在害虫综合治理（integrated pest management, IPM）中越来越受到重视，是害虫防治的关键手段。然而，当寄主受到外来生物侵袭时，必然启动一系列的免疫响应来阻止潜在的威胁，这将严重影响到生物防治的效果。因此，深入开展害虫免疫防御策略的研究，揭示免疫防御与外源物入侵之间的关系，阐明害虫免疫防御的作用机理，对于进一步提高害虫生物防治的效能具有重要意义。

大量研究发现，昆虫的体外防御分泌物质具有免疫及抑菌活性，能调控周围的微生物环境，减少病原体侵染的风险，降低昆虫面临的寄生和捕食压力，帮助昆虫顺利度过不良的环境条件（Otti *et al*., 2014）。但是针对以体外防御分泌物为核心的体外免疫防御策略是如何发挥作用的，以及这种策略和以体液免疫、细胞免疫为核心的体内免疫防御策略之间是如何进行权衡的研究还很少。因此，有关昆虫体外免疫是一个新兴的研究课题，具有很大的发展空间和发展前景，未来的研究将以评估抗菌分泌物与体内免疫之间的关系为重点，但仍存在着很多亟待解决的问题。首先，体外防御物质的来源是什么？功能基因组和系统发育分析表明，与来源于其他代谢通路的基因相比，外部免疫复合物的前体更加可能来源于内部免疫防御基因（Li *et al*., 2013；

Otti et al., 2014；Gupta *et al.*, 2015）。其次，外部免疫防御是否能够被诱导而产生？是否能够表现出专一性的特征？到目前为止，证据是不足的。和内部免疫防御相似，专一性的问题已经引起科学界的关注，因此研究外部免疫防御是否广泛或专一性地发挥作用将有很大的价值。再者，与内部免疫防御相比，外部免疫防御需要付出多少代价，受益多大？虽然已经证明了外部防御分泌物具有抗菌活性，但是仍然需要进一步研究它们所带来的适应性益处和对寄主的影响。因此，未来的研究需阐明体内体外免疫防御的代价和受益之间的权衡关系。最后，外部免疫防御是否是一个更好的选择？正常情况下，外部免疫相对于内部免疫而言是互补还是多余的关系？体内免疫与体外免疫之间的权衡关系及其影响因素如何？这些科学问题的回答和解释将是该领域未来研究的方向。

利用病原生物及其他天敌生物控制害虫，是开展害虫持续控制的关键。从寄主的角度考虑，深入了解害虫对外源物的免疫响应策略，是从侧面间接提升其持续控制效果的关键。害虫具有哪些体外免疫防御分泌物，这些分泌物合成的通路、作用方式和作用效果等问题，是提升生物防治效能的核心。害虫的免疫能力如何影响病原物和天敌生物入侵的特性？免疫防御策略的采用是如何削弱害虫对病原物等的敏感性？害虫体外免疫和体内免疫之间的权衡关系如何？交配、寄主状态、寄主生理及其他因素是如何调控这两种不同的免疫防御策略的？这些问题的回答，将是从免疫学角度探讨害虫为害特性和控制基础的关键所在，进一步为采用生物防治技术有效控制害虫种群提供科学依据。害虫免疫能力方面的信息对于深入了解害虫的猖獗为害机理，采用生物防治技术成功控制其危害等均具有重要的理论和实践意义。此外，有关这方面的研究，不仅有助于加强病原菌及其他天敌田间自然控害效果，而且对于开发以昆虫免疫系统为靶标的新型杀虫剂也有着重要的指导意义。

参考文献（References）

Alexander P, Barton DHR, 1943. The excretion of ethylquinone by the flour beetle. *Biochem. J.*, 37(4): 463 – 465.

Arce AN, Johnston PR, Smiseth PT, Rozen DE, 2012. Mechanisms and fitness effects of antibacterial defences in a carrion beetle. *J. Evol. Biol.*, 25(5): 930 – 937.

Armitage SAO, Siva-Jothy MT, 2005. Immune function responds to selection for cuticular colour in *Tenebrio molitor*. *Heredity*, 94(6): 650 – 656.

Armitage SAO, Thompson JJ, Rolff J, Sivajothy MT, 2003. Examining costs of induced and constitutive immune investment in *Tenebrio molitor*. *J. Evol. Biol.*, 16(5): 1038 – 1044.

Ashida M, Yamazaki HI, 1990. Biochemistry of the phenoloxidase system in insects: with special reference to its activation. In: Onishi E, Ishizki H eds. Molting and Metamorphosis. Scientific Societies Press, Tokyo. 239 – 263.

Ayres JS, Schneider DS, 2009. The role of anorexia in resistance and tolerance to infections in *Drosophila*. *PLoS Biol.*, 7(7): e1000150.

Baracchi D, Mazza G, Turillazzi S, 2012. From individual to collective immunity: the role of the venom as antimicrobial agent in the Stenogastrinae wasp societies. *J. Insect Physiol.*, 58(1): 188 – 193.

Barnes AI, Siva-Jothy MT, 2000. Density-dependent prophylaxis in the mealworm beetle *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera: Tenebrionidae): cuticular melanization is an indicator of investment in immunity. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, 267(1439): 177 – 182.

Beeman RW, Stuart JJ, Haas MS, KS Friesen, 1996. Chromosome extraction and revision of linkage group 2 in *Tribolium castaneum*. *J. Hered.*, 87(3): 224 – 232.

Betz O, Maurer A, Verheyden AN, Schmitt C, Kowalik T, Braun J, Grunwald I, Hartwig A, Neuenfeldt M, 2016. First protein and peptide characterization of the tarsal adhesive secretions in the desert locust, *Schistocerca gregaria*, and the Madagascar hissing cockroach, *Gromphadorhina portentosa*. *Insect Mol. Biol.*, 25(5): 541 – 549.

Blum MS, 1981. Chemical Defenses of Arthropods. Academic Press, London, United Kingdom. 254 – 264.

Blum MS, Walker JR, Callahan PS, Novak AF, 1958. Chemical, insecticidal and antibiotic properties of fire ant venom. *Science*, 128 (3319): 306 – 307.

Brunner FS, Schmidhempel P, Barribeau SM, 2014. Protein-poor diet reduces host-specific immune gene expression in *Bombus terrestris*. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, 281(1786): 130 – 143.

Bucher G, Scholten J, Klingler M, 2002. Parental RNAi in *Tribolium* (Coleoptera). *Curr. Biol.*, 12(3): R85 – R86.

Bulet P, Stöcklin R, Menin L, 2004. Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. *Immunol. Rev.*, 198(1): 169 – 184.

Bulmer MS, Bachelet I, Raman R, Rosengaus RB, Sasisekharan R, 2009. Targeting an antimicrobial effector function in insect immunity as a pest control strategy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106(31): 12652 – 12657.

Bulmer MS, Crozier RH, 2004. Duplication and diversifying selection among termite antifungal peptides. *Mol. Biol. Evol.*, 21(12): 2256 – 2264.

Bulmer MS, Crozier RH, 2006. Variation in positive selection in termite GNBPs and Relish. *Mol. Biol. Evol.*, 23(2): 317 – 326.

Bulmer MS, Denier D, Velenovsky J, Hamilton C, 2012. A common antifungal defense strategy in *Cryptocercus* woodroaches and termites. *Insect. Soc.*, 59(4): 469 – 478.

Chapman RN, 1926. Inhibiting the process of metamorphosis in the

confused flour beetle (*Tribolium confusum* Duval). *J. Exp. Zool.*, 45(1): 293-299.

Chapuisat M, Oppliger A, Magliano P, Christe P, 2007. Wood ants use resin to protect themselves against pathogens. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, 274(1621): 2013-2017.

Christe P, Oppliger A, Bancalà F, Castella G, Chapuisat M, 2003. Evidence for collective medication in ants. *Ecol. Lett.*, 6(1): 19-22.

Corby-Harris V, Promislow DEL, 2008. Host ecology shapes geographical variation for resistance to bacterial infection in *Drosophila melanogaster*. *J. Anim. Ecol.*, 77(4): 768-776.

Cotter SC, Littlefair JE, Grantham PJ, Kilner RM, 2013. A direct physiological trade-off between personal and social immunity. *J. Anim. Ecol.*, 82(4): 846-853.

Cremer S, Armitage SAO, Schmid-Hempel P, 2007. Social immunity. *Curr. Biol.*, 17(16): R693-R702.

Cui XH, Chen YH, Xie M, Wan FH, 2007. Survival characteristics of *Bemisia tabaci* B-biotype and *Trialeurodes vaporariorum* (Homoptera: Aleyrodidae) after exposure to adverse temperature conditions. *Acta Entomol. Sin.*, 50(12): 1232-1238. [崔旭红，陈艳华，谢明，万方浩，2007. B 型烟粉虱和温室白粉虱在温度逆境下的生存特性比较. 昆虫学报，50(12): 1232-1238]

Duffey SS, Blum MS, 1977. Phenol and guaiacol: biosynthesis, detoxication, and function in a polydesmid millipede, *Oxidus gracilis*. *Insect Biochem.*, 7(1): 57-65.

Elsik CG, Worley KC, Bennett AK, Beye M, Camara F, Childers CP, 2014. Finding the missing honey bee genes: lessons learned from a genome upgrade. *BMC Genomics*, 15(1): 86.

Engel P, Moran NA, 2013. The gut microbiota of insects-diversity in structure and function. *FEMS Microbiol. Rev.*, 37(5): 699-735.

Engelhardt M, Rapoport H, Sokoloff A, 1965. Odorous secretion of normal and mutant *Tribolium confusum*. *Science*, 150(3696): 632-633.

Evans JD, Aronstein K, Chen YP, Hetru C, Imler JL, Jiang H, Kanost M, Thompson GJ, Zou Z, Hultmark D, 2006. Immune pathways and defence mechanisms in honey bees *Apis mellifera*. *Insect Mol. Biol.*, 15(5): 645-656.

Fellowes M, Kraaijeveld AR, Godfray HCJ, 1999. Cross-resistance following artificial selection for increased defense against parasitoids in *Drosophila melanogaster*. *Evolution*, 53(3): 966-972.

Feng SS, Hou YM, 2015. Lipopolysacccharide-induced immune response of *Octodonta nipae* (Coleoptera: Chrysomelidae) adults in relation to their genders. *Acta Entomol. Sin.*, 58(1): 28-37. [冯珊珊，侯有明，2015. 脂多糖诱导的水椰八角铁甲免疫响应动态及其在性别间的差异. 昆虫学报，58(1): 28-37]

Fischman BJ, Woodward SH, Robinson GE, 2011. Molecular evolutionary analyses of insect societies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 108(S2): 10847-10854.

Gallo RL, Hooper LV, 2012. Epithelial antimicrobial defence of the skin and intestine. *Nat. Rev. Immunol.*, 12(7): 503-516.

Gasch T, Schott M, Wehrenfennig C, Düring RA, Vilcinskas, 2013. Multifunctional weaponry: the chemical defenses of earwigs. *J. Insect Physiol.*, 59(12): 1186-1193.

Goff AM, Nault LR, 1974. Aphid cornicle secretions ineffective against attack by parasitoid wasps. *Environ. Entomol.*, 3(3): 565-566.

Görgen G, Fröβl C, Boland W, Dettner K, 1990. Biosynthesis of 1-alkenes in the defensive secretions of *Tribolium confusum* (Tenebrionidae): stereochemical implications. *Experientia*, 46(7): 700-704.

Graystock P, Hughes WHO, 2011. Disease resistance in a weaver ant, *Polyrhachis dives*, and the role of antibiotic-producing glands. *Behav. Ecol. Sociobiol.*, 65(12): 2319-2327.

Gross J, Schumacher K, Schmidtberg H, Vilcinskas A, 2008. Protected by fumigants: beetle perfumes in antimicrobial defense. *J. Chem. Ecol.*, 34(2): 179-188.

Guan WP, 1987. Defensive substances in some insects. *J. Shenyang Agric. Univ.*, 18(Suppl.): 53-57. [关万鹏，1987. 浅谈一些昆虫的防御物质. 沈阳农业大学学报，18(增刊): 53-57]

Guo M, Hu RH, Wu RH, Zhou JZ, 2013. A Practical Course on Instrument Analysis. Zhejiang University Press, Hangzhou. 369-370. [郭明，胡润淮，吴荣晖，周建钟，2013. 实用仪器分析教程. 杭州：浙江大学出版社. 369-370]

Guo ZF, Ren GD, An QR, 2000. Analysis chemistry of the secrtions from *Blaps femorolis* Fischer-Waldheim. *J. Hebei Univ.* (*Nat. Sci. Ed.*), 20(Suppl.): 122-124. [郭志峰，任国栋，安秋荣，2000. 齿琵甲防御腺分泌物的分析. 河北大学学报(自然科学版)，20(增刊): 122-124]

Gupta SK, Kupper M, Ratzka C, Feldharr H, Vilcinskas A, Gross R, Dandekar T, Förster F, 2015. Scrutinizing the immune defence inventory of *Camponotus floridanus* applying total transcriptome sequencing. *BMC Genomics*, 16(1): 540.

Hamilton C, Lay F, Bulmer MS, 2011a. Subterranean termite prophylactic secretions and external antifungal defenses. *J. Insect Physiol.*, 57(9): 1259-1266.

Hamilton C, Lejeune BT, Rosengaus RB, 2011b. Trophallaxis and prophylaxis: social immunity in the carpenter ant *Camponotus pennsylvanicus*. *Biol. Lett.*, 7(1): 89-92.

Happ GM, 1968. Quinone and hydrocarbon production in the defensive glands of *Eleodes longicolis* and *Tribolium castaneum* (Coleoptera, Tenebrionidae). *J. Insect Physiol.*, 14(12): 1821-1837.

Herzner G, Schlecht A, Dollhofer V, Parzefall C, Harrar K, Kreuzer A, Pilsl L, Ruther J, 2013. Larvae of the parasitoid wasp *Ampulex compressa* sanitize their host, the American cockroach, with a blend of antimicrobials. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 110(4): 1369-1374.

Hoffmann JA, Rcichhart JM, Hetru C, 1996. Innate immunity in higher insects. *Curr. Opin. Immunol.*, 8(1): 8-13.

Hou YM, Weng ZQ, 2010. Temperature-dependent development and life table parameters of *Octodonta nipae* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Environ. Entomol.*, 39(5): 1676-1684.

Hua RX, Hou YM, Shi ZH, 2014. Changes in the contents of physiologically active substances in *Octodonta nipae* (Coleoptera: Chrysomelidae) after low temperature acclimation. *Acta Entomol. Sin.*, 57(3): 265-273. [华瑞香，侯有明，石章红，2014. 低温

驯化后水椰八角铁甲生理活性物质含量的变化. 昆虫学报, 57(3): 265 – 273]

Joop G, Roth O, Schmid-Hempel P, Kurtz J, 2014. Experimental evolution of external immune defences in the red flour beetle. *J. Evol. Biol.*, 27(8): 1562 – 1571.

Kaltenpoth M, Engl T, 2014. Defensive microbial symbionts in Hymenoptera. *Funct. Ecol.*, 28(2): 315 – 327.

Khan I, Prakash A, Agashe D, 2016. Immunosenescence and the ability to survive bacterial infection in the red flour beetle *Tribolium castaneum*. *J. Anim. Ecol.*, 85(1): 291 – 301.

Kramer KJ, Kanost MR, Hopkins TL, Jiang H, Zhu YC, Xu R, Kerwin JL, Turecek F, 2001. Oxidative conjugation of catechols with proteins in insect skeletal systems. *Tetrahedron*, 57(2): 385 – 392.

Kuhn-Nentwig L, 2003. Antimicrobial and cytolytic peptides of venomous arthropods. *Cell. Mol. Life Sci.*, 60(12): 2651 – 2668.

Lazzaro BP, Little TJ, 2009. Immunity in a variable world. *Philos. Trans. R. Soc. B*, 364(1513): 15 – 26.

Lazzaro BP, Rolff J, 2011. Danger, microbes, and homeostasis. *Science*, 332(6025): 43 – 44.

Le Conte Y, Alaux C, Martin JF, Harbo JR, Harris JW, Dantec C, Séverac D, Cros-Arteil S, Navajas M, 2011. Social immunity in honeybees (*Apis mellifera*): transcriptome analysis of varroa-hygienic behavior. *Insect Mol. Biol.*, 20(3): 399 – 408.

Li J, Lehmann S, Weiβbecker B, Naharros IO, Schütz S, Joop G, Wimmer EA, 2013. Odoriferous defensive stink gland transcriptome to identify novel genes necessary for quinone synthesis in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *PLoS Genet.*, 9(7): e1003596.

Li JL, Zhang X, Hou YM, Tang BZ, 2014. Effects of multiple mating on the fecundity of an invasive pest (*Octodonta nipae*): the existence of an intermediate optimal female mating rate. *Physiol. Entomol.*, 39(4): 348 – 354.

Li W, Ren GD, Liu FS, 2009. Chemical composition and antibiotic activity of the defensive secretion of *Blaps femoralis*. *Chin. Bull. Entomol.*, 46(3): 424 – 428. [李伟, 任国栋, 柳峰松, 2009. 弯齿琵甲防御分泌物的化学成分测定及抗菌活性分析. 昆虫知识, 46(3): 424 – 428]

Liang YS, 1995. The behavior response of *Tribolium castaneum* adults and larvae on the main components of its defensive secretion. *J. Chin. Cereals Oils Assoc.*, 10(4): 18 – 22, 28. [梁永生, 1995. 赤拟谷盗成虫和幼虫对其防御性分泌物主要成分的行为反应. 中国粮油学报, 10(4): 18 – 22, 28]

Liu Y, Luo CY, Li L, Xie XT, 2000. Study on antibiotic activity and GC-MS analysis of Yunnan Balaps's defensive secretion. *J. Yunnan Univ.* (*Nat. Sci. Ed.*), 22(3): 217 – 219. [刘勇, 罗氚芸, 李蕾, 谢笑天, 2000. 云南琵琶甲防御性分泌物抗菌活性及 GC-MS 分析. 云南大学学报(自然科学版), 22(3): 217 – 219]

Lorenzen MD, Doyungan Z, Savard J, Snow K, Crumly LR, Shippy TD, Stuart JJ, Brown SJ, Beeman RW, 2005. Genetic linkage maps of the red flour beetle, *Tribolium castaneum*, based on bacterial artificial chromosomes and expressed sequence tags. *Genetics*, 170(2): 741 – 747.

Lü HS, 2008. Principles of Insect Immunology. Shanghai Scientific and Technical Publishers, Shanghai. 43 – 96. [吕鸿声, 2008. 昆虫免疫学原理. 上海: 上海科学技术出版社. 43 – 96]

Lusebrink I, Dettner K, Seifert K, 2008. Stenusine, an antimicrobial agent in the rove beetle genus *Stenus* (Coleoptera, Staphylinidae). *Sci. Nat.*, 95(8): 751 – 755.

Marrone PG, Maclnyosh SC, 1993. Resistance to *Bacillus thuringiensis* and resistance management. In: Entwistle PE and Cory JS eds. Biopesticides: Theory and Practice. John Wiley and Sons, Chichester, U.K. 135 – 221.

Meinwald J, Koch KF, Rogers JE, Eisner T, 1966. Biosynthesis of arthropod secretions. III. Synthesis of simple p-benzoquinones in a beetle (*Eleodes longicollis*). *J. Am. Chem. Soc.*, 88(7): 1590 – 1592.

Meng E, Tang BZ, Hou YM, Chen XX, Chen JT, Yu XQ, 2016. Altered immune response of *Octodonta nipae* (Maulik) to its pupal endoparasitoid, *Tetrastichus brontispae* Ferrière. *Comp. Biochem. Physiol. B*, 198: 100 – 109.

Mikkola K, Rantala MJ, 2010. Immune defence, a possible nonvisual selective factor behind the industrial melanism of moths (Lepidoptera). *Biol. J. Linn. Soc.*, 99(4): 831 – 838.

Moreau SJM, 2013. "It stings a bit but it cleans well": venoms of Hymenoptera and their antimicrobial potential. *J. Insect Physiol.*, 59(2): 186 – 204.

Otti O, Tragust S, Feldhaar H, 2014. Unifying external and internal immune defences. *Trends Ecol. Evol.*, 29(11): 625 – 634.

Prendeville HR, Stevens L, 2002. Microbe inhibition by *Tribolium* flour beetles varies with beetle species, strain, sex, and microbe group. *J. Chem. Ecol.*, 28(6): 1183 – 1190.

Pryor MGM, 1940. On the hardening of the cuticle of insects. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, 128(852): 393 – 407.

Pu YC, Hou YM, 2016. Isolation and identification of bacterial strains with insecticidal activities from *Rhynchophorus ferrugineus* Oliver (Coleoptera: Curculionidae). *J. Appl. Entomol.*, 140(8): 617 – 626.

Pu YC, Huang B, Hou YM, 2015. Inbreeding depression in captive-raised diamondback moths. *Chin. J. Appl. Entomol.*, 52(5): 1244 – 1250. [蒲宇辰, 黄斌, 侯有明, 2015. 室内饲养的小菜蛾种群近交衰退分析. 应用昆虫学报, 52(5): 1244 – 1250]

Pu YC, Ma TL, Hou YM, Sun M, 2017. An entomopathogenic bacterium strain, *Bacillus thuringiensis*, as a biological control agent against the red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* (Coleoptera: Curculionidae). *Pest Manag. Sci.*, 73(7): 1494 – 1502.

Qiang CK, Yang ZF, Du YZ, Tan DF, Zheng FS, 2006a. Study on the antimicrobial activity of the defensive secretion of *Tenebrio molitor* L. *Biotechnology*, 16(1): 22 – 24. [强承魁, 杨兆芬, 杜予州, 檀东飞, 郑福山, 2006a. 黄粉虫防御性分泌物抑菌活性的研究. 生物技术, 16(1): 22 – 24]

Qiang CK, Yang ZF, Zhang SY, 2006b. Analysis of chemical constituent in defensive secretions of *Tenebrio molitor* by GC-MS. *Chin. Bull. Entomol.*, 43(3): 385 – 389. [强承魁, 杨兆芬, 张

绍雨，2006b. 黄粉虫防御性分泌物化学成分的 GC-MS 分析. 昆虫知识，43(3)：385－389]

Ratzka C, Liang C, Dandekar T, Gross R, Feldhaar H, 2011. Immune response of the ant *Camponotus floridanus* against pathogens and its obligate mutualistic endosymbiont. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 41(8)：529－536.

Roh JY, Choi JY, Li MS, Jin BR, Je YH, 2007. *Bacillus thuringiensis* as a specific, safe, and effective tool for insect pest control. *J. Microbiol. Biotechn.*, 17(4)：547－559.

Rolff J, Armitage SAO, Coltman DW, 2005. Genetic constraints and sexual dimorphism in immune defense. *Evolution*, 59(8)：1844－1850.

Rolff J, Siva-Jothy MT, 2003. Invertebrate ecological immunology. *Science*, 301(5632)：472－475.

Rollins-Smith LA, Reinert LK, O'Leary CJ, Houston LE, Woodhans DC, 2005. Antimicrobial peptide defenses in amphibian skin. *Integr. Comp. Biol.*, 45(1)：137－142.

Rose RI, Briggs JD, 1969. Resistance to American foulbrood in honey bees IX. Effects of honey-bee larval food on the growth and viability of *Bacillus* larvae. *J. Invertebr. Pathol.*, 13(1)：74－80.

Rosengaus RB, Traniello JFA, Bulmer MS, 2011. Ecology, behavior and evolution of disease resistance in termites. In：Bignell DE, Roisin Y, Lo N eds. Biology of Termites：A Modern Synthesis. Springer Netherlands, Dordrecht. 165－191.

Rosengaus RB, Traniello JFA, Lefebvre ML, Maxmen AB, 2004. Fungistatic activity of the sternal gland secretion of the dampwood termite *Zootermopsis angusticollis*. *Insect. Soc.*, 51(3)：259－264.

Roth LM, 1943. Studies on the gaseous secretion of *Tribolium confusum* Duval. II. The odoriferous glands of *Tribolium confusum*. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 36(3)：397－424.

Roth LM, Eisner T, 2003. Chemical defenses of arthropods. *Annu. Rev. Entomol.*, 7(1)：107－136.

Roth O, Kurtz J, 2008. The stimulation of immune defence accelerates development in the red flour beetle (*Tribolium castaneum*). *J. Evol. Biol.*, 21(6)：1703－1710.

Rowell-Rahier M, Pasteels JM, 1994. A comparison between allozyme data and phenotypic distances from defensive secretion in *Oreina* leaf-beetles (Chrysomelinae). *J. Evol. Biol.*, 7(4)：489－500.

Sadd BM, Schmid-Hempel P, 2009. Principles of ecological immunology. *Evol. Appl.*, 2(1)：113－121.

Schmid-Hempel P, 2011. Evolutionary Parasitology. Oxford University Press, Oxford. 536 pp.

Schumacher MJ, Schmidt JO, Egen NB, Dillon KA, 1992. Biochemical variability of venoms from individual European and Africanized honeybees (*Apis mellifera*). *J. Allergy Clin. Immun.*, 90(1)：59－65.

Shi ZH, Liang H, Hou YM, 2016. Functional analysis of a NF-κB transcription factor in the immune defense of oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* Hendel (Diptera：Tephritidae). *Bull. Entomol. Res.*, 107(2)：251－260.

Shi ZH, Lin YT, Hou YM, 2014. Mother-derived trans-generational immune priming in the red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* Olivier (Coleoptera, Dryophthoridae). *Bull. Entomol. Res.*, 104(6)：742－750.

Shi ZH, Lin YT, Hou YM, Zhang HY, 2015. Humoral immunocompetence shifts in response to developmental stage change and mating access in *Bactrocera dorsalis* Hendel (Diptera：Tephritidae). *Bull. Entomol. Res.*, 105(2)：166－172.

Silva FWS, Araujo LS, Azevedo DO, Serrão JE, Elliot SL, 2016. Physical and chemical properties of primary defences in *Tenebrio molitor*. *Physiol. Entomol.*, 41(2)：121－126.

Simone M, Evans JD, Spivak M, 2009. Resin collection and social immunity in honey bees. *Evolution*, 63(11)：3016－3022.

Souza DJD, Lenoir A, Kasuya MCM, Ribeiro MMR, Devers S, Couceiro JDC, Lucia TMCD, 2013. Ectosymbionts and immunity in the leaf-cutting ant *Acromyrmex subterraneus*. *Brain Behav. Immun.*, 28(2)：182－187.

Suderman RJ, Dittmer NT, Kanost MR, Kramer KJ, 2006. Model reactions for insect cuticle sclerotization：cross-linking of recombinant cuticular proteins upon their laccase-catalyzed oxidative conjugation with catechols. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 36(4)：353－365.

Tang BZ, Xu L, Hou YM, 2014. Effects of rearing conditions on the parasitism of *Tetrastichus brontispae* on its pupal host *Octodonta nipae*. *BioControl*, 59(6)：647－657.

Theopold U, Schmidt O, Soderhall K, Dushay MS, 2004. Coagulation in arthropods：defence, wound closure and healing. *Trends Immunol.*, 25(6)：289－294.

Thompson CR, Brogan RS, Scheifele LZ, Rivers DB, 2013. Bacterial interactions with necrophagous flies. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 106(6)：799－809.

Tomoyasu Y, Miller SC, Tomita S, Schoppmeier M, Grossmann D, Bucher G, 2008. Exploring systemic RNA interference in insects：a genome-wide survey for RNAi genes in *Tribolium*. *Genome Biol.*, 9(1)：R10.1－R10.22.

Tragust S, Mitteregger B, Barone V, Konrad M, Ugelvig LV, Cremer S, 2013. Ants disinfect fungus-exposed brood by oral uptake and spread of their poison. *Curr. Biol.*, 23(1)：76－82.

Tranter C, Graystock P, Shaw C, Lopes JFS, Hughes WHO, 2014. Sanitizing the fortress：protection of ant brood and nest material by worker antibiotics. *Behav. Ecol. Sociobiol.*, 68(3)：499－507.

Trauner J, Schinko J, Lorenzen MD, Shippy TD, Wimmer EA, Beeman RW, Klingler M, Bucher G, Brown SJ, 2009. Large-scale insertional mutagenesis of a coleopteran stored grain pest, the red flour beetle *Tribolium castaneum*, identifies embryonic lethal mutations and enhancer traps. *BMC Biol.*, 7(1)：73.

Tribolium Genome Sequencing Consortium, 2008. The genome of the model beetle and pest *Tribolium castaneum*. *Nature*, 452(7190)：949－955.

Ulrich KR, Feldlaufer MF, Kramer M, Leger RJS, 2015. Inhibition of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* sensu lato *in vitro* by the bed bug defensive secretions (*E*)-2-hexenal and (*E*)-2-octenal. *BioControl*, 60(4)：517－526.

Ulrich KR, Kramer M, Feldlaufer MF, 2016. Ability of bed bug

(Hemiptera: Cimicidae) defensive secretions (*E*)-2-hexenal and (*E*)-2-octenal to attract adults of the common bed bug *Cimex lectularius*. *Physiol. Entomol.*, 41(2): 103-110.

Unruh LM, Xu R, Kramer KJ, 1998. Benzoquinone levels as a function of age and gender of the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 28(12): 969-977.

Vannini L, Willis JH, 2016. Immunolocalization of cuticular proteins in Johnston's organ and the corneal lens of *Anopheles gambiae*. *Arthropod Struct. Dev.*, 45(6): 519-535.

Vásquez A, Forsgren E, Fries I, Paxton RJ, Flaberg E, Szekely L, Olofsson TC, 2012. Symbionts as major modulators of insect health: lactic acid bacteria and honeybees. *PLoS ONE*, 7(3): e33188.

Vilcinskas A, 2013. Evolutionary plasticity of insect immunity. *J. Insect Physiol.*, 59(2): 123-129.

Wang L, Wang S, Li Y, Paradesi MS, Brown SJ, 2007. BeetleBase: the model organism database for *Tribolium castaneum*. *Nucleic Acids Res.*, 35(Database Issue): D476-D479.

Wang XP, Lei CL, Niu CY, 2001. The defensive secretion from insects. *Chin. Bull. Entomol.*, 38(5): 392-395. [王香萍, 雷朝亮, 牛长缨, 2001. 昆虫的体外化学防卫物质简介. 昆虫知识, 38(5): 392-395]

Wang YC, 2004. Insect Physiology. China Agriculture Press, Beijing. 145-158. [王荫长, 2004. 昆虫生理学. 北京: 中国农业出版社. 145-158]

Waterhouse RM, Kriventseva EV, Meister S, Xi Z, Alvarez KS, Bartholomay LC, Barillas-Mury C, Bian G, Blandin S, Christensen BM, Dong Y, Jiang H, Kanost MR, Koutsos AC, Levashina EA, Li J, Ligoxygakis P, MacCallum RM, Mayhew GF, Mendes A, Michel K, Osta MA, Paskewitz S, Shin SW, Vlachou D, Wang L, Wei W, Zheng L, Zou Z, Severson DW, Raikhel AS, Kafatos FC, Dimopoulos G, Zdobnov EM, Christophides GK, 2007. Evolutionary dynamics of immune-related genes and pathways in disease-vector mosquitoes. *Science*, 316(5832): 1738-1743.

Xu L, Lan JL, Hou YM, Chen YS, Chen ZX, Wong ZQ, 2011. Molecular identification and pathogenicity assay on *Metarhizium* against *Octodonta nipae* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Chin. J. Appl. Entomol.*, 48(4): 922-927. [徐利, 蓝江林, 侯有明, 陈玉森, 陈智雄, 翁章权, 2011. 感染水椰八角铁甲的绿僵菌的分子鉴定及致病力测定. 应用昆虫学报, 48(4): 922-927]

Xu YL, Li WC, 2010. Research progress in activation mechanisms of phenoloxidse in insects. *J. Anhui Agric. Sci.*, 38(27): 14844-14846. [徐亚玲, 李文楚, 2010. 昆虫酚氧化酶作用机制的研究进展. 安徽农业科学, 38(27): 14844-14846]

Xu ZF, 2009. General Entomology. Science Press, Beijing. 3-4. [许再福, 2009. 普通昆虫学. 北京: 科学出版社. 3-4]

Yezerski A, Ciccone C, Rozitski J, Volingavage B, 2007. The effects of a naturally produced benzoquinone on microbes common to flour. *J. Chem. Ecol.*, 33(6): 1217-1225.

Yezerski A, Cussatt G, Glick D, Evancho M, 2005. The effects of the presence of stored product pests on the microfauna of a flour community. *J. Appl. Microbiol.*, 98(2): 507-515.

Yezerski A, Gilmor TP, Stevens L, 2004. Genetic analysis of benzoquinone production in *Tribolium confusum*. *J. Chem. Ecol.*, 30(5): 1035-1044.

Zera AJ, Harshman L, 2001. The physiology of life history trade-offs in animals. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, 32(1): 95-126.

Zhou Y, Badgett MJ, Bowen JH, Vannini L, Orlando R, Willis JH, 2016. Distribution of cuticular proteins in different structures of adult *Anopheles gambiae*. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 75: 45-57.

Zhu S, Peigneur S, Gao B, Umetsu Y, Ohki S, Tytgat J, 2014. Experimental conversion of a defensin into a neurotoxin: implications for origin of toxic function. *Mol. Biol. Evol.*, 31(3): 546-559.

(责任编辑: 马丽萍)